

## Wechselwirkungen zwischen fördernden und hemmenden Substanzen der Blutgerinnung

Es ist bekannt, dass eine Thrombokinasen in Gegenwart einer zweiten anderer Herkunft Plasma in kürzerer Zeit zur Gerinnung bringen kann, als wenn sie allein in optimaler Menge verwendet wird<sup>1</sup>. Ähnliche Aktivitätssteigerungen können auch nach Zugabe von an sich inaktivem Serum<sup>2</sup> oder von verschiedenen, in der Literatur beschriebenen Faktoren<sup>3</sup> erzielt werden. Die dabei wirksamen Stoffe sind in ihrer chemischen Natur unbekannt. Die Mitteilung eines ähnlichen Phänomens mit chemisch teils gut definierten Substanzen, die physiologisch-schwerweise vorkommen und deren eine stark gerinnungsverzögernd wirkt, ist von besonderem Interesse.

An den zu beschreibenden Reaktionen, die mit Hühnerplasma als Gerinnungssubstrat ausgeführt wurden, nehmen u.a. der aus Schweinehirn hergestellte, lipoider, thermostabile Aktivator und der Aminoalkohol Sphingosin teil. Der genannte Aktivator beschleunigt die Gerinnung von Hühnerplasma und ist der ständige Begleiter der Kephale, ohne jedoch mit dem eigentlichen Kephalin identisch zu sein<sup>4</sup>. Die zweite Substanz, Sphingosin, verzögert die Gerinnung stark; sie findet sich stets als mehr oder weniger starke Verunreinigung des Sphingomyelins. Diesem Umstand ist vermutlich die von CHARGAFF<sup>5</sup> beobachtete, gerinnungshemmende Wirkung der Sphingomyeline zuzuschreiben, da wir fanden, dass reine, sphingosinfreie Präparate keinerlei Einfluss auf die Gerinnung ausüben<sup>6</sup>. Die verwendeten Thrombokinasen sind in der Tabelle aufgeführt.

Wir beobachteten regelmässig, dass die Verkürzung der Gerinnungszeit des Plasmas durch den lipoiden Gerinnungsaktivator dann vergrössert ist, wenn das Gerinnungsmilieu gleichzeitig Sphingosin enthält. Gleiche Mengen Sphingosin allein verzögern dagegen die Gerinnung des Plasmas bis zu 24 h<sup>7</sup>. Wird das Plasma vor Zugabe des lipoiden Gerinnungsaktivators während einer Stunde mit Sphingosin bei 39°C inkubiert, so verkürzen sich die Gerinnungszeiten auf  $\frac{1}{3}$ – $\frac{1}{6}$  der ohne Inkubation erhaltenen Werte. Die 4. Spalte der Tabelle demonstriert dieses «Inkubationseffekt» genannte Phänomen. Aus den Werten der horizontalen, jeweils zusammengehörigen Reihen a und b, die innerhalb eines Versuches mit ein und demselben Plasma erhalten wurden, ist ersichtlich, dass der Einfluss selbst der doppelten Menge Sphingosin unter den gegebenen Versuchsbedingungen gering ist.

Nach Inkubation des lipoiden Aktivators mit Sphingosin ist die Aktivität dieser Mischung gegenüber Plasma unverändert. Es muss somit am Zustandekommen des Inkubationseffektes ein Bestandteil des Plasmas mitwirken<sup>8</sup>.

Weitere Versuche zeigten, dass die beschleunigte Gerinnung in gleichem Ausmass auch durch direkte

Zugabe bestimmter Thrombokinasen erzielt werden kann. Bei *gleichzeitigem* Zufügen von lipoidem Aktivator, Sphingosin und Thrombokinasen aus Rinderlunge oder menschlicher Plazenta werden also *ohne* vorhergehende Inkubation des Plasmas mit Sphingosin Gerinnungszeiten erhalten (Spalte 6), die ebenso kurz sind wie diejenigen, die der lipoider Aktivator mit Plasma *nach* dessen einstündiger Inkubation mit Sphingosin ergibt (Spalte 4). Wie der Versuch 2b zeigt, ist hierfür zuweilen die doppelte Sphingosinkonzentration erforderlich.

Der lipoider Aktivator, zusammen mit Thrombokinasen aus Rinderlunge oder menschlicher Plazenta, gibt mit sphingosinhaltigem Plasma vor und nach Inkubation praktisch gleiche Gerinnungszeiten (Spalte 6).

Es handelt sich bei diesem Effekt nicht um eine Addition der Wirkungen von lipoidem Aktivator und Thrombokinasen. Die kurzen Gerinnungszeiten, wie sie mit dem lipoiden Aktivator, Thrombokinasen und sphingosinhaltigem Plasma ohne Inkubation erzielt werden (Spalte 6), können so weder vom lipoiden Aktivator (Spalte 4) noch von den Thrombokinasen allein erreicht werden, von letzteren nicht einmal nach vorhergegangener Plasma-Sphingosin-Inkubation (Spalte 5). Das Entstehen einer zusätzlichen Aktivität scheint sicher zu sein.

In einer ausführlicheren Mitteilung werden wir zeigen, dass entsprechende Mischungen von lipoidem Aktivator und Thrombokinasen mit sphingosinfreiem Plasma nie die kurzen Gerinnungszeiten des sphingosinhaltigen Plasmas ergeben.

Die nach QUICK aus Kaninchenhirn dargestellte Thrombokinasen unterscheidet sich in ihrem Verhalten von den Thrombokinasen anderer Herkunft (Versuch 5 und 6). Dieser Befund steht im Einklang mit den ebenfalls abweichenden Ergebnissen bei unseren vergleichenden papierchromatographischen Studien über verschiedene Aktivatoren und mit deren Verhalten bei den klinischen Einstufen-Prothrombinbestimmungen. Ausserdem ist auffallend, dass mit Quickscher Thrombokinasen und mit lipoidem Aktivator nach Inkubation des Plasmas mit Sphingosin prinzipiell eine starke Aktivitätssteigerung eintritt. Wir weisen in diesem Zusammenhang auf die Tatsache hin, dass beide Aktivatoren aus Hirngewebe bereitet werden.

Eine Diskussion der vorliegenden Befunde ist ebenso schwierig wie problematisch. Im menschlichen Blut kommen sowohl der lipoider Aktivator wie Sphingosin und, entsprechend dem Postulat der meisten Untersucher, eine Plasmathrombokinasen vor. Falls letztere die gleichen Eigenschaften wie die von uns untersuchten Thrombokinasen aus Lungen- und Plazentagewebe zeigen sollte und alle Faktoren mit humanem Plasma und Hühnerplasma gleich reagieren, würden unserem Organismus alle für die oben beschriebenen Reaktionen notwendigen Stoffe zur Verfügung stehen. Ein Gleichgewicht dieser Faktoren würde eine normale Gerinnung gewährleisten, und Konzentrationsverschiebungen derselben könnten am Entstehen pathologischer Zustände mit beschleunigter (Thrombose) oder verzögerter Gerinnung (Hämophilie u.a.) mitwirken. TOCANTINS und Mitarbeiter<sup>1</sup> machen hierfür auf Grund langjähriger Untersuchungen eine Verminderung bzw. eine Erhöhung der Konzentration des von ihnen beschriebenen Inhibitors «Antithromboplastin» verantwortlich. Eigenen Untersuchungen zufolge halten wir den Inhibitor von TOCANTINS für identisch mit dem durch Sphingosin stark verunreinig-

<sup>1</sup> S. GOLLUB, F. E. KAPLAN, D. R. MERANZE und H. TUFT, *Science* 110, 563 (1949). – S. GOLLUB, F. E. KAPLAN und D. R. MERANZE, *Amer. J. Physiol.* 162, 293 (1950), und *J. Lab. Clin. Med.* 36, 463 (1950).

<sup>2</sup> R. F. JACOB, *J. Clin. Invest.* 28, 492 (1949).

<sup>3</sup> R. BIGGS, Vortrag 4. Europ. Hämatologenkongress in Amsterdam, September 1953.

<sup>4</sup> A. FISCHER und E. HECHT, *Biochem. Z.* 269, 115 (1934). – E. HECHT, *Sang* 21, 486 (1950).

<sup>5</sup> E. CHARGAFF, *Science* 85, 548 (1937); *J. biol. Chem.* 121, 175 und 187 (1937); 125, 677 (1938).

<sup>6</sup> E. HECHT, *Acta Haematol.* 9, 237 (1953).

<sup>7</sup> E. HECHT, *Nature* 167, 279 und 633 (1951); *Nederl. Tijdschr. Geneesk.* 95, 2371 (1951); *Chem. Weekbl.* 47, 905 (1951).

<sup>8</sup> E. HECHT, *Acta Haematol.* 9, 237 (1953).

<sup>1</sup> L. M. TOCANTINS und R. T. CARROLL, *Blood Clotting and Allied Problems* (J. E. Flynn, New York 1949).

Sphingosineffekt und Thrombokinasen

Thrombokinasen aus	Nr.	Sphingosin in mm <sup>3</sup>	Gerinnungszeiten des sphingosinhaltigen Plasmas mit					
			lipoidem Aktivator		Thrombokinasen		lipoidem Aktivator + Thrombokinasen	
			vor Inkubation	nach Inkubation	vor Inkubation	nach Inkubation	vor Inkubation	nach Inkubation
Rinderlunge . . . . .	1 a)	30	3'05"	42"	1'18"	1'20"	53"	1'06"
	b)	60	3'28"	1'02"	2'01"	1'53"	1'13"	1'04"
Rinderlunge . . . . .	2 a)	30	3'35"	58"	1'30"	1'08"	1'50"	1'06"
	b)	60	3'23"	1'09"	1'33"	1'41"	58"	1'00"
Menschliche Plazenta . . . . .	3 a)	30	5'23"	55"	2'30"	1'19"	53"	44"
	b)	60	4'55"	1'00"	2'41"	2'13"	50"	55"
Menschliche Plazenta . . . . .	4 a)	30	9'35"	1'45"	3'15"	1'58"	1'45"	1'33"
	b)	60	9'30"	2'18"	4'00"	2'25"	1'43"	1'39"
Kaninchenhirn (QUICK) . . . . .	5 a)	30	4'00"	1'05"	10'55"	1'30"	6'30"	1'20"
	b)	60	4'25"	1'28"	13'00"	3'09"	5'00"	2'25"
Kaninchenhirn (QUICK) . . . . .	6 a)	30	3'54"	1'13"	21'00"	1'49"	6'49"	1'14"
	b)	60	4'23"	1'15"	17'50"	1'26"	6'18"	1'08"

*Zusammensetzung des Gerinnungsmediums.* 150 mm<sup>3</sup> Hühnerplasma, 30 (a) bzw. 60 mm<sup>3</sup> (b) Sphingosin (5 mg/l cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O) und 30 mm<sup>3</sup> der jeweils angeführten Substanzen: lipoider Gerinnungsaktivator (6 mg/l cm<sup>3</sup> NaCl), Thrombokinasen aus Rinderlunge (50 mg/l cm<sup>3</sup> NaCl), aus menschlicher Plazenta (Handelsprodukt der Amsterdamschen Chininfabrik «A.C.F.»-50 mg/l cm<sup>3</sup> NaCl) oder aus Kaninchenhirn nach QUICK (20 mg/l cm<sup>3</sup> NaCl). Die Reaktionsmischungen wurden mit H<sub>2</sub>O bzw. physiologischer NaCl-Lösung auf 270 mm<sup>3</sup> gebracht. Technik der Gerinnungsbestimmungen nach HECHT<sup>1</sup>.

ten lipoiden Aktivator<sup>2</sup>. Auf die Möglichkeit einer Verwendung unserer Befunde zur Stützung der von TOCANTINS 1954 neuerdings in erweiterter Form mitgeteilten Theorie der Blutgerinnung<sup>3</sup> kann an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden.

Der lipoiden Aktivator und Sphingosin könnten in geeigneten Mengenverhältnissen auch am Aufbau der «Plasmathrombokinasen» beteiligt sein. Immerhin entwickelt einerseits der lipoiden Aktivator mit sphingosininkubiertem Plasma eine Aktivität, die sonst nur den Thrombokinasen zukommt, und andererseits kann derselbe Effekt wie nach vorausgehender Plasma-Sphingosin-Inkubation durch gleichzeitige Zugabe von lipoidem Aktivator, Sphingosin und Thrombokinasen zu Plasma auch ohne Inkubation erreicht werden. Zudem ist entsprechend der Auffassung von HOWELL<sup>4</sup> der lipoiden, thermostabile Aktivator der wesentliche Bestandteil der meist thermolabilen Thrombokinasen.

Endlich erachten wir es für möglich, dass bei vielen in der Literatur beschriebenen gerinnungsfördernden und -hemmenden Faktoren die wirksamen Stoffe mit den Komponenten der von uns mitgeteilten Reaktionen identisch sind.

E. HECHT

*Physiologisch-chemisches Institut der Rijksuniversiteit Utrecht, Abt. Blutgerinnung, den 26. Mai 1954.*

Summary

The reactions of the lipid activator and different thrombokinasen, both alone and together with sphingosine-containing plasma, are described. In connection with the results reported, the possible significance of the physiological substances for the physiopathology of blood clotting, and the generation of plasma thrombokinasen, is discussed.

Ricerche farmacologiche sui lisati di organi

VII. Azione dei lisati di muscolo sul cuore di Rana bloccato mediante la prima legatura di STANNIUS

*Premesse.* Praticando una legatura a qualsiasi livello degli atri del cuore di Rana, a partire dal punto di sbocco del seno venoso nell'atrio destro, fino al limite del solco atrio-ventricolare, si provoca l'arresto immediato dell'organo in tutte le parti sottostanti la legatura, mentre quelle sovrastanti continuano a pulsare con ritmo inalterato (prima legatura di STANNIUS). Se nel cuore così bloccato si pratica una seconda legatura, in corrispondenza del solco atrio-ventricolare, il ventricolo ricomincia a pulsare (seconda legatura di STANNIUS). Il fenomeno s'ottiene sia sul cuore isolato che *in situ*.

Le classiche esperienze dello Stannius sono troppo note perché ci si debba soffermare a illustrarle in dettaglio; d'altra parte, tutte le ipotesi avanzate per poter interpretare l'intimo meccanismo dei fenomeni non hanno resistito ad una critica rigorosa<sup>1</sup>. Diremo soltanto che il blocco provocato dalla prima legatura è, generalmente, reversibile spontaneamente, per cui, dopo un periodo di arresto più o meno lungo, che può protrarsi fino a un'ora, le pulsazioni riprendono. Se, però, prima di operare la legatura, s'è provveduto a rimuovere ogni residuo di sangue, mediante un accurato lavaggio con liquido di RINGER, la riattivazione spontanea del cuore non s'ottiene, rimanendo esso inerte fino alla morte (SKRAMLIK<sup>2</sup>).

Da ricerche che da tempo andiamo conducendo (SCARINCI<sup>3</sup>; SCARINCI e ZARA<sup>4</sup>), sono emerse attività pecu-

<sup>1</sup> Per una dettagliata rassegna sull'argomento, vedasi la monografia del C. J. ROTHBERGER, in A. BETHE e G. BERGMANN, *Handbuch der normalen und pathologischen Physiologie* (Julius Springer, Berlin 1926).

<sup>2</sup> E. SKRAMLIK, *Pflüger's Arch.* 183, 120 (1920).

<sup>3</sup> V. SCARINCI, *Arch. int. Pharmacodyn.* 82, 365 (1950).

<sup>4</sup> V. SCARINCI e E. ZARA, *Arch. Sci. biol.* 37, 388 (1953); *ibid.*, in stampa.

<sup>1</sup> E. HECHT, *Acta med. Scand.* 102, 79 (1939).

<sup>2</sup> E. HECHT, *Acta Physiol. Pharmacol. Neerl.* 2, 134 (1951).

<sup>3</sup> L. M. TOCANTINS, *Blood* 9, 281 (1954).

<sup>4</sup> W. H. HOWELL, *Amer. J. Physiol.* 31, 1 (1912).